Aus der Medizinischen Universitäts Poliklinik Würzburg
Direktor: Prof. Dr. Franke

DIE BESTIMMUNG DER CYCLISCHEN NUKLEOTIDE MIT HILFE DER VAKUUM-VERDAMPFUNGSMETHODE UND IHRE ANWENDUNG BEI PIRACETAM AM BEHANDELTEN MEERSCHWEINCHEN IM FRONTALHIRN

I n a u g u r a l - D i s s e r t a t i o n

verfaßt und der
Hohen Medizinischen Fakultät
der
Julius-Maximilians-Universität Würzburg
zur
Erlangung der medizinischen Doktorwürde

vorgelegt von

Gosbert Weth
aus Schweinfurt

Würzburg, den 28. Juni 1981

Aus der Medizinischen Universitäts Poliklinik Würzburg
Direktor: Prof. Dr. Franke

DIE BESTIMMUNG DER CYCLISCHEN NUKLEOTIDE MIT HILFE DER VAKUUM-VERDAMPFUNGSMETHODE UND IHRE ANWENDUNG BEI PIRACETAM AM BEHANDELTEN MEERSCHWEINCHEN IM FRONTALHIRN

I n a u g u r a l - D i s s e r t a t i o n

verfaßt und der
Hohen Medizinischen Fakultät
der
Julius-Maximilians-Universität Würzburg
zur
Erlangung der medizinischen Doktorwürde

vorgelegt von

Gosbert Weth
aus Schweinfurt

Würzburg, den 28. Juni 1981

Referent: Prof. Dr. W. Gross

Korreferent: Prof. Dr. H. Franke

Dekan: Prof. Dr. K. H. Wulf

Tag der mündlichen Prüfung: 2.11.1981

UNIV. LEIDEN BIBL.

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität Würzburg

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
1. Einleitung	1
2. Allgemeiner Teil	3
2.1. Bekannte biochemische Fakten über Piracetam	3
2.2. Allgemeine Fakten über cAMP	3
2.3. Zelluläre Funktionen von cAMP	5
2.4. Die Hormonverstärkung von cAMP	7
2.5. Die angewandten cAMP-Bestimmungen	10
3. Ergebnisse	14
3.1. Untersuchungsmaterial	14
3.1.1. Meerschweinchen	14
3.1.2. Piracetamkonzentration	14
3.2. Präparation der Tiere	15
3.3. Aufarbeitung des Gewebes	15
3.4. Säulenchromatographie	15
3.5. Eindampfungsverfahren	16
3.6. Die RIA-Bestimmungen (nach Arbeitsvorschrift von Becton-Dickinson)	18
3.7. cAMP-Bestimmung von Hirngewebe	19
3.8. Graphische Darstellung der Streubreite der cAMP-Werte	21
3.9. Graphische Darstellung der Mittelwerte der cAMP-Bestimmung	22
3.10 Statistische Auswertung	23
4. Zusammenfassung der Ergebnisse	24
4.1. Methode	24
4.1.1. Trichloressigsäuremethode	24

Seite

4.1.2. Perchlorsäure-Methode 24

4.1.3. Vakuumverdampfungsmethode 24

4.2. Meßergebnisse von cAMP 25

5. Diskussion 27

5.1. Methoden 27

5.1.1. Trichloressigsäuremethode 27

5.1.2. Perchlorsäure-Methode 27

5.1.3. Vakuum-Verdampfungs-Methode 28

5.2. Meßergebnisse von cAMP 29

5.2.1. Die Bestimmung von cAMP im Gehirn (Frontalhirn) 29

5.2.2. Wertung der Ergebnisse 29

6. Allgemeine Zusammenfassung 31

7. Literatur 32

1. EINLEITUNG

Die Substanz Piracetam ist ein Derivat der cyclischen Gamma-Amino-Buttersäure (GABA), die für die Therapie hirnorganisch bedingter psychischer Störungen angewandt wird. Die klinische Anwendung stützt sich auf tierexperimentelle Untersuchungsergebnisse und kontrollierte klinische Studien und Doppelblindstudien. Dabei fand man, daß die Substanz in die Lern- und Gedächtnisvorgänge eingreift und funktionell-zerebrale Leistungen des alternden Menschen (6, 17, 26, 57, 58) Defektsyndrome bei hirnatrophischen Prozessen (13, 17, 26, 62, 67), Durchgangssyndrome und Folgezustände bei Schädel-Hirntraumen (1, 11, 16, 41, 55, 56, 71), alkohol- und arzneitoxische Gehirnschäden (2, 5, 6, 8, 9, 12, 39, 40, 67, 69, 73) und das Lernvermögen bei chronisch-cerebralen Störungen von Kindern (25, 60, 66, 70, 76) beeinflußt.

Es bietet sich deshalb an, die Substanz auf ihre biochemische Wirkung hin zu untersuchen. Frühere Testergebnisse liegen bereits vor, die sich besonders auf den energiereichen Phosphatstoffwechsel (PEDE et al. 1971, GOBERT 1972, ROCHUS et al. 1972) die Reorganisation von Polyribosomen (BURONOTTE et al. 1973), die Messung von Enzymaktivitäten und Leucineinbauraten (PLATT et al. 1974) beziehen. Es sollte deshalb untersucht werden, ob die Substanz einen Einfluß auf die cyclischen Nukleotide hat.

Das cyclische Adenosin Monophosphat (cAMP) findet sich im ganzen Tierreich und in Bakterien. 1958 entdeckte E. SUTHERLAND und T. W. RALL, daß die Wirkung von Adrenalin und Glukagon auf den Stoffwechsel durch das cAMP vermittelt wird. Diese Entdeckung führte zu der Erkenntnis, daß cAMP in allen Lebensformen auftritt und eine Schlüsselrolle in der Steuerung biologischer Prozesse spielt. Die Synthese dieses Regulatormoleküls wird aus ATP durch die Adenyl-

cyclase, die mit der Plasmamembran assoziiert ist, katalysiert. Viele Peptidhormone, z.B. ACTH, LH, TSH, Oxytocin und biogene Amine wirken über eine Erhöhung des cAMP-Spiegel in der Zelle.

Es ist deshalb verständlich, daß verschiedene Autoren (STEINER et al., ALBANE, HARPER, LEVKOWITZ, RALL, SUTHERLAND, HELMREICH et al.) daran arbeiteten, eine effektive Methode zur cAMP-Bestimmung zu finden. Erst in den siebziger Jahren erschienen zwei Methoden, die es erlauben, Pico-Mol-Konzentrationen zu bestimmen. Eine Methode benutzt die cAMP-abhängige Proteinkinase, die vom Rindermuskel isoliert wurde und cAMP spezifisch bindet (GILMAN, 1970). Eine andere Methode wurde von STEINER et al. (1972) entwickelt und wird radioimmunologisch durchgeführt.

Diese Arbeit beschäftigt sich mit der von STEINER et al. entwickelten Radioimmunoessay. In ihr soll gezeigt werden, daß durch Verwendung von technischen Neuerungen eine wesentliche Steigerung der Ausbeute erzielt werden kann.

Für die Untersuchung wurden 22 Meerschweinchen verwendet. Sechs Tiere wurden davon unbehandelt getötet und der cAMP-Spiegel im Frontalhirn und Darm bestimmt. Anschließend wurden zwei Tiere acht Tage mit Piracetam und weitere acht Tage ohne Piracetam gefüttert und zur gleichen Zeit wie die übrigen 14 Meerschweinchen, die 16 Tage lang mit Piracetam gefüttert wurden, auf den cAMP-Spiegel im Frontalhirn untersucht.

Ziel der Arbeit ist es, herauszufinden, ob die Substanz Piracetam Einfluß auf die cAMP-Konzentration hat.

2. ALLGEMEINER TEIL

2.1. BEKANNTE BIOCHEMISCHE FAKTEN ÜBER PIRACETAM

Die Substanz Piracetam (2-Oxy-Pyrrolidin-1-Acetamid) ist das cyclische Derivat der Gamma-Aminobuttersäure. Sie wird heute therapeutisch bei hypoxischen, toxischen, traumatischen und infektiösbedingten Gehirnschädigungen eingesetzt.

Durch biochemische Untersuchungen wurde der Einfluß von Piracetam auf den energiereichen Phosphatstoffwechsel (PEDE et al. 1971, GOBERT 1972, ROCHUS et al. 1972), die Reorganisation von Polyribosomen (BURNOTTE et al. 1973) und die Messung von lysosomalen Enzymen (ß-Glucuronidase, ß-Acetylglucosaminidase und Kathepsin D), sowie die Einbaurate einer essentiellen Aminosäure (^{14}C-D-Leucin) im Gehirn (PLATT, et al. 1974) gefunden. Auch konnte gezeigt werden, daß die Proteinkonzentration im Lysosomensediment ansteigt (PLATT 1973).

2.2. ALLGEMEINE FAKTEN ÜBER cAMP

Das cAMP ist der zweite Bote bei der Wirkung vieler Hormone. Der erste Bote ist das Hormon selbst. Grundzüge dieser Vorstellung sind folgende:

2.2.1. Zellen besitzen Hormonrezeptoren in der Plasmamembran.

2.2.2. Die Verbindung eines Hormons mit einem spezifischen Rezeptor in der Plasmamembra-n führt zu Stimulierungen der Adenylcyclase, die ebenfalls an der Membran gebunden ist.

2.2.3. Die gesteigerte Aktivität der Adenyl-Cyclase erhöht die Menge an cyclischem AMP in der Zelle.

2.2.4. Das cAMP ändert dann innerhalb der Zelle die Geschwindigkeit eines oder mehrerer Prozesse.

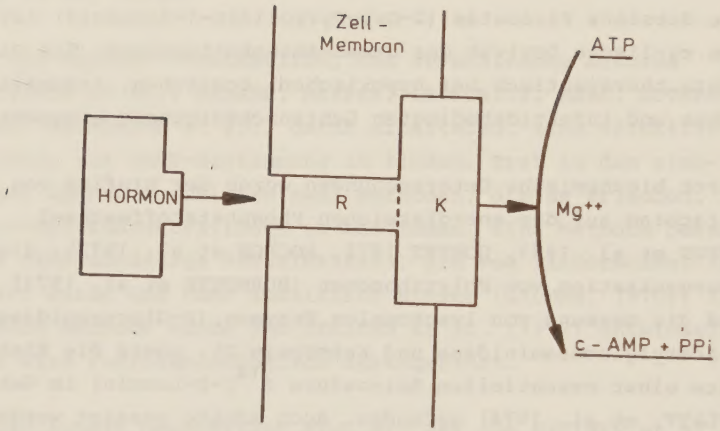


Abb. 1: Modell des Adenyl-Cyclase-Komplexes (K)
Dargestellt ist der Vorgang, wenn ein Hormon einen Zelloberflächenrezeptor (R) bindet und die darauffolgende Aktivierung der Adenylcyclase bewirkt (ROBINSON, BUTCHER und SUTHERLAND, 1967).

Eine wichtige Eigenschaft des second-messenger-Modells ist, daß das Hormon nicht in die Zelle eindringen muß. Es entfaltet seine Wirkung an der Zellmembran. Die biologischen Effekte des Hormons werden in der Zelle vom cAMP und nicht vom Hormon selbst vermittelt. Eine Anzahl von experimentellen Kriterien wurde zur Überprüfung der Gültigkeit dieses Konzepts benutzt:

Die Adenylcyclase wird von Hormonen aktiviert, die auf die Zelle einwirken. Hormone, die keine charakteristisch biologische Antwort in dieser Zelle hervorrufen, sollten ihren Cyclase-Spiegel nicht anheben.

Die Konzentration des cAMP in den Zielzellen soll in direktem Verhältnis zu ihrer biologischen Antwort auf hormonale Stimulierung stehen, sowohl in kinetischer als auch in Abhängigkeit von Hormonkonzentrationen betreffender Hinsicht.

Inhibitoren der Phosphor-Diesterase, z.B. Theophyllin und Coffein wirken synergistisch mit Hormonen, die cAMP als zweiten Boten haben und deren Abbau verhindern. Die biologischen Effekte des Hormons sollten durch Zugabe von cAMP oder einer verwandten Verbindung zu den Zielzellen nachgeahmt werden. cAMP kann nicht in Zellen eindringen. Polare Derivate des cAMP jedoch, z.B. Dibuturyl-cAMP, können in Zellen eintreten und aktiv werden.

Viele Experimente zeigen, daß cAMP als zweiter Bote für viele Hormone neben Adrenalin und Glukagon verantwortlich ist. Andere Hormone mit der Wirkung über das cAMP sind Noradrenalin, Vasopresin, Tyroxin, Parathormon, das LH, melanozytenstimulierendes Hormon, sowie Prostaglandine (HAMBRECHT u. SCHULTZ, zitiert nach Traber 1976). Außerdem beeinflußt cAMP noch außerordentlich zelluläre Prozesse. So rufen die Lipolyse, Glukogenabbau, Glukoneogenese, Ketogenese, Ionenpermeabilität der Epithelien, Renin-Produktion der Niere, Kontraktion des Herzmuskel, HCL-Sekretion der Magenschleimhaut, Amylase-Freisetzung der Speicheldrüse, Dispersion der Melaningranula und die Insulinfreisetzung im Pankreas eine Zunahme des cAMP hervor. Die Plättchen-Aggregation, Glucose und das Tumorzellwachstum in Gewebszellen führen zu einer Abnahme des cAMP (Zusammenfassung nach STRYER, 1979, LENINGER, 1979).

2.3. ZELLULÄRE FUNKTIONEN VON cAMP

EDWIN KREBS und DONALD WALSH entdeckten, daß das cAMP eine Proteinkinase des Skelettmuskels aktiviert. Die Proteinkinase

phosphoryliert sowohl die Glykogensynthetase (die dabei inaktiv wird) als auch die Phosphorylase-Kinase, die dabei aktiv wird. Auf diese Weise stimuliert das cAMP im Muskel den Glykogen-Abbau und hemmt die Glykogen-Synthese. Ein ähnlicher Mechanismus existiert in der Leber. Tatsächlich gehen viele Effekte des cAMP auf die Aktivierung von Proteinkinasen zurück. Fast alle bisher untersuchten Zellen enthalten Proteinkinasen, die vom cAMP in Konzentrationen von etwa 10^{-8} M aktiviert werden. Diese Kinasen ändern die Aktivität verschiedener Proteine in verschiedenen Zellen, indem sie sie phosphorylieren. In Abwesenheit des cAMP bilden die beiden Untereinheiten der Proteinkinase einen enzymatisch inaktiven Kompl ex. Durch cAMP dissoziiert dieser Komplex. Die regulatorische Untereinheit bindet das cAMP, die frei katalytische Untereinheit ist nun enzymatisch aktiv.

Offensichtlich hat das cAMP eine lange Entwicklungsgeschichte als Regulatormolekül. Ursprünglich war es ein Hungersignal. In Bakterien hat cAMP heute noch diese Funktion. Es signalisiert einen Glukosemangel und führt zur Synthese von Enzymen, die andere Energiequellen nutzen können. In einigen Säugerzellen, z.B. Leber- und Muskelzellen hat das cAMP seine ursprüngliche Rolle als Hungersignal beibehalten. Es wirkt jedoch durch Stimulierung der Proteinkinase und nicht durch Anregung der Transkription bestimmter Gene. Es stellt sich somit die Frage, warum das cAMP im Laufe der Evolution zum second messenger wurde. Da cAMP aus ATP, einem ubiquitären Molekül, in einer einfachen Reaktion entsteht, die durch nachfolgende Hydrolyse von Pyrrophosphat energetisch möglich wird, hat das cAMP keinen Hauptstoffwechselweg. Somit kann seine Konzentration unabhängig kontrolliert werden. Außerdem ist es wärmestabil, falls es nicht von der Phosphordiesterase gespalten wird.

Das cAMP kann durch eine genügende Anzahl funktioneller Gruppen an Rezeptorenproteine spezifisch gebunden werden

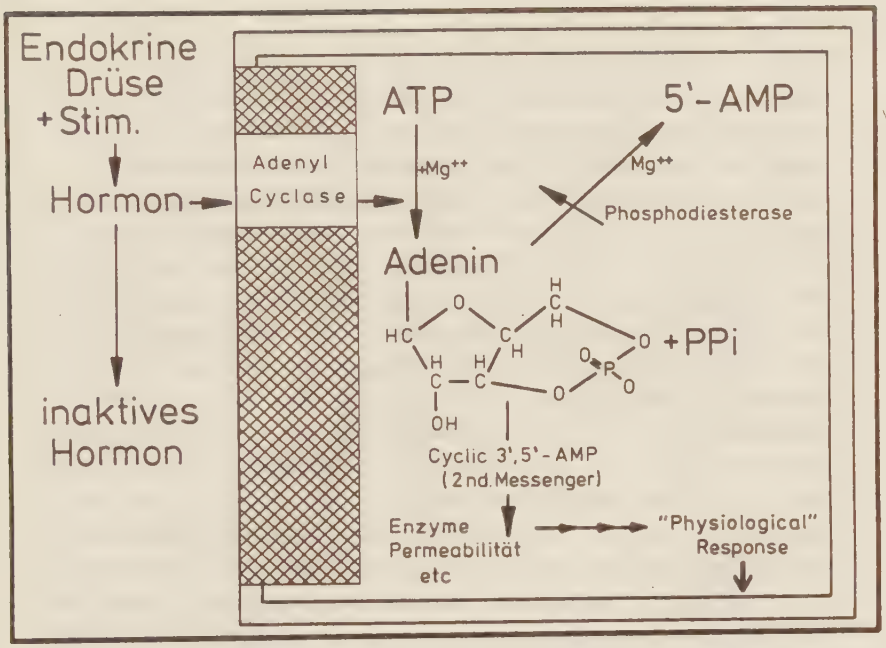


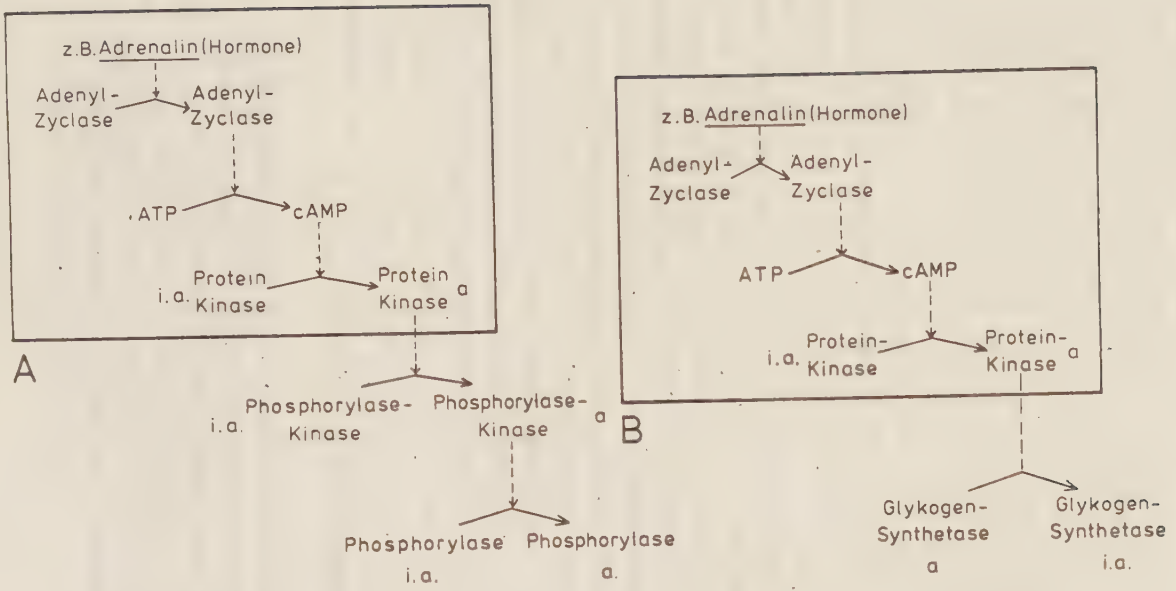
Abb. 2: Zelluläre Funktion von cAMP
Die Wirkung eines Hormons auf die Zelle

und als regulatorische Untereinheiten wirken (STREYER, 1979).

2.4. DIE HORMONVERSTÄRKUNG VON cAMP

Das cAMP führt zu einer Hormonverstärkung. Das Hormonsignal wird durch die Verwendung von cAMP als second messenger hochverstärkt. Die Blutkonzentration vieler Hormone liegt in der Größenordnung von 10^{-10}. In einer stimulierten Zelle ist die Konzentration von cAMP ca. 10^{-6} molar. Somit führt die Synthese des cAMP durch eine aktivierte Adenyl-Cyclase in der Plasmamembran zu einer 10^{4}fachen Verstärkung des

Hormons. Die Aktivierung der Proteinkinase durch cAMP erzeugt eine weitere Verstärkung, da die Proteinkinase eine beträchtliche Wechselzahl hat. Die Enzymkaskade bei der Kontrolle des Glykogenstoffwechsels hat noch ein oder zwei Schritte mehr, was zu einer weiteren Verstärkung des ursprünglichen Hormonreizes führt. So treten Adrenalin und Glukagon nur an die Zellmembran hin und vermitteln über die Adenylcyclase die Bildung von cAMP, das zur Aktivierung der Phosphorylase und zur Hemmung der Glykogensynthetase führt. Unter den meisten physiologischen Bedingungen ist die Phosphorylase b inaktiv, da sie durch ATP und Glucose-6-Phosphat gehemmt wird. Im Gegensatz dazu ist die Phosphorylase a vollaktiv, unabhängig von AMP, ATP und Glucose-6-Phosphat-Spiegel. Die Phosphorylase-Kinase kann teilweise auch auf einem anderen Weg durch Calcium-Ionen in der Größenordnung von 10^{-7} aktiviert werden. Die Aktivierungsart der Kinase besitzt biologische Bedeutung, da die Muskelkontraktion durch Freisetzung von Calzium ausgelöst wird. Die Phosphorylierung führt also zu entgegengesetzer Auswirkung auf die enzymatischen Aktivitäten der Glykogensynthetase und Phosphorylase.



Eine Kaskade von Reaktionen wird durch die Bildung von cAMP ausgelöst.
Die Proteinkinase und Phosphorylase wird aktiviert,
die Glykogensynthetase wird inaktiviert.

2.4.1. Ein Hormon, z.B. Adrenalin wird von der Plasmamembran der Muskelzelle gebunden und stimuliert die Adenyl-Cyclase.

2.4.2. Die Adenyl-Cyclase, die an der Plasmamembran gebunden ist, katalysiert die Entstehung des cAMP. Dadurch wird eine Erhöung des intrazellulären Spiegels von cAMP hervorgerufen, der die Proteinkinase aktiviert. Die Kinase ist bei Abwesenheit von cAMP inaktiv, wie zuvor beschrieben. Die Bildung von cAMP stimuliert dann allosterisch die Proteinkinase.

2.4.3. Die Phosphorylierung dieser vom cAMP abhängigen Kinase schaltet die Phosphorylase an und gleichzeitig die Glykogensynthetase ab.

Wenn die Glykogen-Phosphorylase und die Glykogen-Synthetase direkt durch Bildung von Adrenalin reguliert würden, wäre 1000mal mehr Adrenalin zur Auslösung des Glykogen-Abbaus erforderlich als beim Vorhandensein der verstärkten Kaskade. So ist das Adrenalin nicht das einzige Signal zur Stimulierung des Glykogen-Abbaus in der Muskulatur. Eine niedrige Energieladung führt zum gleichen Effekt, da die Phosphorylase b unter diesen Bedingungen durch reversible Bindung von AMP aktiviert wird. Der Glykogen-Abbau wird auch durch eine erhöhte Calzium-Konzentration stimuliert, die während der Muskelkontraktion auftritt.

2.5. DIE ANGEWANDTEN cAMP-BESTIMMUNGEN

Die ersten Messungen von cAMP im tierischen Gewebe wurden mit biologischen Bestimmungsmethoden durchgeführt. Das cAMP mußte gereinigt werden bevor es mit einem Multi-Enzymsystem bestimmt werden konnte (RALL, SHUTHERLAND 1958, GLODBERG, LANER, SASKO und O'TOOLE, 1969). Diese Bestimmungsmethoden nahmen viel Zeit in Anspruch und haben nicht die Genauigkeit, um intrazelluläre Konzentrationen von

cyclischen Adenosin-Nukleotiden in Milligramm-Mengen von Gewebe zu erfassen. In den frühen 70er Jahren konnten zwei Methoden erscheinen, welche es erlauben, Picomo-Konzentrationen von cAMP zu bestimmen. Eine Methode benutzte cAMP-abhänge Proteinkinase, die vom Rindermuskel isoliert wurde und cAMP spezifisch bindet (GILMAN 1970) und die andere ist eine Radioimmunessay entwickelt von STEINER, PARKER und KIEP-NESS 1972. Die Gilman-Protein-Bindungs-Methode für Adenosin-3-5-cyclisches Monophosphat beruht auf der kompetitiven Bindung von radioaktiv markiertem c-AMP mit Standard oder extrahiertem cAMP als der Grundlage der Bestimmung. Da die Bindungskonstante nahezu 10^{-7} molar ist, können Bestimmungen mit Konzentrationen von 0,10 Picomol cAMP durchgeführt werden. Der Nukleotid-Protein-Komplex wird auf einen Zellulose-Acetat-Filter absorbiert und die Radioaktivität durch Flüssigkeitsszintilationszähler bestimmt. Selbst eine 50%ige Inhibition von Cyclo-AMP-Bindung wird durch eine 25 000fache Konzentration an ATP und einer 125fachen Konzentration von cGMP erreicht. Eine alternative Bestimmungsmethode für Adenyl-Cyclase wird von Albano, Mauzley, Braun und Barnes 1973 beschrieben, die ein cAMP-bindendes Protein benutzen. Auch bei dieser Methode wird das Gilman-Protein angewandt. Mit dieser Methode werden ebenfalls hohe Hintergrundswerte beobachtet, wenn säulenchromatographische Reinigung nicht vorgenommen wird und wenn der Reaktionsstoff aus Kochen für 3 Minuten besteht. Die Albano-et al.-Methode (1973) hat jedoch große Vorteile gegenüber den vorhergehenden, da diese Methode schnellere und extensivere Enzym-Bestimmungen erlaubt.

Eine weitere Vorschrift bietet die von U. A. MOTO (242), die von J. TRAPPER (1976) aus der Arbeitsgruppe HAMBRECHT modifiziert wurde. Muskelfleisch aus frischer Schlachtung wurde in Eis ins Labor gebracht und eingefroren. Die Aufarbeitung wurde bei $4^{\circ}C$ vorgenommen. So wurden 250 g Fleisch in gefrorenem Zustand mit dem Messer in kleine Scheibchen

zerschnitten und in 750 ml 4 M EDTA-Lösung pH 7,0 ca. 3 x 2 Min. homogenisiert. Durch weiteres Aufarbeiten wurde die Proteinlösung auf eine DEAE-Zellulose-Säule (WORTMANN DE 52,2, 5 x 30 cm) gebracht. Das cAMP-Bindungsprotein wurde eluiert mit einem Kalium-Phosphat-Puffer pH 7,0.

In den hier beschriebenen Methoden können sehr niedrige Aktivitäten von cAMP mit hoher Genauigkeit und in kurzem Zeitraum bestimmt werden. Noch niedrigere Proteinkonzentrationen können angewandt werden, wenn cAMP nach der vorher erwähnten Methode von HARPER und BRUKER 1975 acetyliert wird. In allen Fällen sollte, nachdem die Reaktion gestoppt ist, eine Reinigung von cAMP auf eine Aluminium-Oxid-Säule mit 0,2 molaren Natrium-Acetat-Puffern, pH 6,2 nach der Methode von JACOBS, BÖHME und SCHULZ (1975) vorgenommen werden, um Kreuzreaktionen mit ATP auszuschließen. Die oft angewandte Methode von WYATT und ZENSER (1971), die auch eine Aluminium-Oxyd-Säule vorschreibt, aber bei der die Elution mit 0,05 molar Tris-HCL, pH 7,6 verlangt wird, zeigt eine Gewinnung von nur 80 % für cAMP und 50 % für cGMP.

Das Radioimmunessay von STEINER et al. (1972) beruht auf einer kompetitiven Bindung zwischen einem Antikörper, der von einem Kaninchen gegen ein succinyliertes Konjugat von cAMP mit Humanserum-Albumin synthetisiert wird und einem Jod 125 markierten Tyrosin-Methylester-Derivat der succinylierten cAMP. Die Verdrängung des ^{125}jodierten Derivates vom Antikörper durch Standard oder extrahiertem cAMP ist auch die Grundlage dieser Arbeit.

Diese Bestimmungsmethode ist hochempfindlich, so daß Messungen zwischen 0,01 bis 10,0 pmol cAMP durchgeführt werden können. Sie hat auch einen zusätzlichen Vorteil, indem Gammaszintillationszähler benutzt werden können. Viele Bestimmungen sind nur mit Tritium markiertem cAMP möglich. An unserer Klinik können nur Arbeiten mit J^{125} markiertem RIA

ausgeführt werden. Die Kreuzreaktivität des Antikörpers zu Guanosin-cyclischem Nukleotid ist so niedrig, daß, um eine Verdrängung der Größenordnung von cAMP zu erreichen, eine 10000fache Konzentration von cGMP vorliegen oder eine 50000fache Konzentration an Mono-, Di-, Triphosphat Adenosin Nukleotid vorhanden sein muß (REILLY, Wissenschaftliche Reihe, Becton Dickinson).

Da die intrazelluläre Konzentration von ATP in Zellen doch in kreuzreaktiven Konzentrationen vorliegen kann, wird eine Trennung von cAMP vom ATP benötigt. Ein Reinigungsschritt wird auch im Falle der Benutzung des Gilman-Proteins erforderlich. Dieser besteht aus einer selektiven Elution der cyclischen Nukleotide aus einem Aluminiumoxid-Gel mit 0,2 M Natrium-Acetat-Puffer pH 6,2 (REILLY). Das Radioimmunessay von STEINER et al. hat auch für die Bestimmung von Guanyl-cyclischem Nukleotid Anwendung gefunden. Das Antigen wird aus einem Konjugat von succinyliertem cGMP mit Hämocyanin hergestellt. Dadurch ist es möglich, eine differenzierte Bestimmung von zwei bekannten hormonellen Second-messenger (cAMP, cGMP) durchzuführen. In solchen Bestimmungen, wo eine noch höhere Empfindlichkeit benötigt wird, z.B. im Nervengewebe, soll es möglich sein, mit Femtomol (10^{-15}M) Konzentrationen an cyclischem Nukleotid zu bestimmen, wenn eine Acetylierung von cAMP mit Essigsäure Anhydrid vorgenommen wird (HARPER and BROKER 1975). Die Autoren behaupten, daß die Reinigung der cyclischen Nukleotide nicht notwendig ist, da eine Kreuzreaktivität durch erhöhte Aktivität des Haptens zum Antikörper vorkommt. Dies konnte jedoch nicht bestätigt werden. Deshalb wurden Versuche mit dieser Bestimmungsmethode wieder aufgegeben.

3. ERGEBNISSE

3.1. UNTERSUCHUNGSMATERIAL

3.1.1. Meerschweinchen

Für die Untersuchung wurden 22 weiße Meerschweinchen aus einem Inzuchtstamm verwendet. Das Gewicht der ausgewachsenen Tiere lag zwischen 500 und 600 g.

Die Tiere wurden in drei Gruppen eingeteilt. Davon wurden sechs Tiere für die cAMP-Bestimmung im Gehirn als Standard verwendet. Die restlichen 16 Tiere wurden mit der Substanz Piracetam gefüttert. Zwei Tiere erhielten acht Tage täglich einmal Piracetam und weitere acht Tage kein Piracetam. Beide Tiere wurden unter den restlichen Tieren gehalten und an den gleichen Tagen für die cAMP-Bestimmung wie die übrigen 14 Tiere verwendet. Dieser Versuch wurde deshalb durchgeführt, um eine mögliche Beeinflussung der Ergebnisse durch die sozialen Umstände (Stall, Verpflegung, Pflege) auszuschließen.

Die restlichen 14 Tiere wurden 16 Tage mit täglich 100 µl Piracetam-Lösung (aus einer NOOTROP-Ampulle) gefüttert. Die Hälfte der Tiere wurde am 16. Tag kurz nach der Fütterung und die andere Hälfte am folgenden Tag circa 12 - 18 Stunden später für die Untersuchung verwendet.

3.1.2. Piracetamkonzentration

Die tägliche Konzentration von 100 µl Piracetam-Lösung wurde mit Hilfe einer Beckmannpipette peroral verabreicht. Sie entsprach 20 mg Piracetam. Umgerechnet auf einen 60 kg schweren Patienten wäre dies eine tägliche Menge von nahezu 2,400 g. Die tägliche Dosis in der Therapie liegt zwischen 2 - 3 g.

3.2. PRÄPARATION DER TIERE

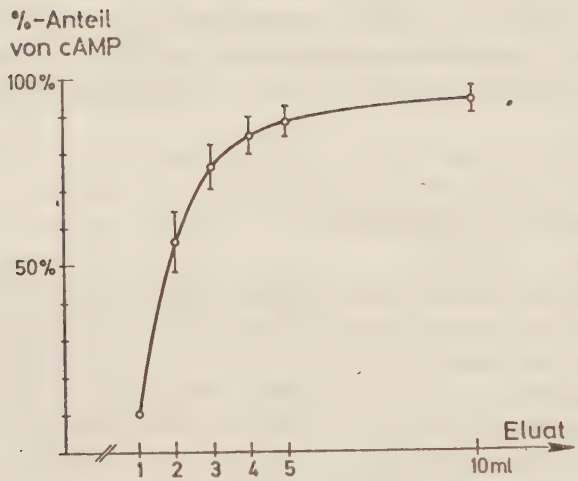
Die 22 Tiere wurden mit Äther narkotisiert und unter Betäubung entblutet. Nach der Freipräparation von Gehirn wurden Gewebeteile zwischen 30 und 50 mg auf der Mikrowaage abgewogen.

3.3. AUFARBEITUNG DES GEWEBES

Die Gewebeteilchen wurden mit 0,6 molarer Perchlorsäure versetzt, mit dem Homogenisator (Ultra-Turax) bei 5000 U/Min für 10 Sekunden homogenisiert und zweimal nachgewaschen mit der gleichen Inkubationslösung. Anschließend wurde die homogenisierte Lösung mit 100 µl 5-normaler Kaliumcarbonatlösung (K_2CO_3) neutralisiert und in der Kühlzentrifuge bei 4°C und 4000 Umdrehungen pro Minute zentrifugiert. Der Niederschlag wurde verworfen. Der Überstand wurde chromatographisch gereinigt (WETH 1981).

3.4. SÄULENCHROMATOGRAPHIE

Durch die Neutralisation mit Kaliumcarbonat wurde die Lösung neutralisiert. Anschließend wurden die Lösungen auf die Säulen (Biorad-Säule AG1 x 8 Harz, 100-200 mesh oder auf die Dowex 50 w - x 8, 100 - 200 mesh) aufgetragen. Nach dem Waschen mit 10 ml H_2O wurden die Säulen mit 0,1 N HCl eluiert. Die ersten vier eluierten ml wurden verwendet zum Eindampfen. Die Ausbeute betrug 80 %. In der folgenden Graphik wurde radioaktiv markiertes cAMP aufgetragen. Die Graphik zeigt das Eluationsprofil.



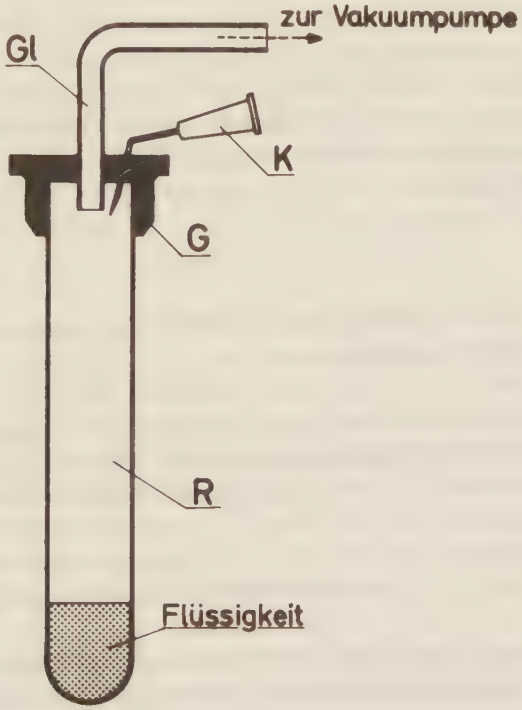
3.5. EINDAMPFUNGSVERFAHREN

Bisher wurden Lösungen bei höheren Temperaturen unter Luftstrom (Stickstoff) eingedampft. Auch dieses Verfahren wurde zunächst hier angewendet, jedoch zeigte sich, daß eine Elutionsflüssigkeit von 4 ml ca. 4 - 6 Stunden benötigte, selbst wenn die Temperatur des Wasserbades, in dem die Proben eingedampft wurden, 60°C betrug. Deshalb war es notwendig, ein Verfahren zu erreichen, mit dem man erheblich schneller die Eluationsflüssigkeit zum Trocknen eindampfen konnte.

Dies konnte erreicht werden durch die Konstruktion einer einfachen Anlage. Mit ihr war es möglich, die Eluationsflüssigkeit in einem Zehntel der Zeit zu beseitigen.

Dadurch konnte ein erheblicher Arbeitsaufwand und möglicher

Verlust durch Wärme abgefangen werden. Die Graphik zeigt die einfache Konstruktion. Ein Gummipfropfen, der von einer Ampuwa-Flasche stammt, wurde mit einem Glasrohr durchstochen und an eine Wasserstrahlpumpe angeschlossen. Wurde nun die Flüssigkeit unter Vacuum abgesaugt, so verdampfte die Lösung sehr schnell, jedoch trat oft ein Siedeverzug ein. Deshalb war auch dieses Verfahren nicht voll anwendbar.



G = Gummistopfen

Gl = Glasrohr

R = Reagenzglas

K = Kanüle

Das Problem des Siedeverzuges konnte durch eine erneute einfache Lösung geklärt werden. Eine Injektionsnadel wurde durch den Gummi gestochen und somit konnten geringe Mengen von Luft durch die Lösung ziehen, ohne daß das Vacuum erheblich reduziert wurde. Ein Siedeverzug trat unter dieser Anordnung nicht mehr auf, da stets die geringe Menge an Luft ausreichte, um ein plötzliches Abspringen des Niederschlages zu verhindern. Durch diese einfache Anordnung konnte die Ausbeute erheblich gesteigert werden (30 %). Dieses Verfahren wurde auch von anderen Universitäts-Instituten jetzt übernommen. Bisher wurden diese Konzentrationsmengen durch einen teuren Rotationsverdampfer beseitigt, der viel mehr Zeit in Anspruch nahm und noch erhebliche Nachteile hat. Das Eindampfen durch Gefriertrocknung ist ebenfalls zeitaufwendig.

3.6. DIE RIA-BESTIMMUNGEN (NACH ARBEITSVORSCHRIFT VON BECTON-DICKINSON)

Bei jeder Messung wurde eine Standardkurve aufgestellt. Es wurden stets Konzentrationen mit 0,025 - 10,0 pmol pro Röhrchen hergestellt. Sämtliche Niederschläge wurden mit einem Natrium-Acetat-Puffer (pH 6,5) versetzt und auf gleiche Volumenmengen gebracht, d.h. die zu bestimmenden Proben wurden mit 1,5 ml Natrium-Acetat-Puffer versetzt.

3.6.1. Aus dieser Probe wurden 300 µl entnommen und wie der Standard verarbeitet. Es wurden stets Doppelbestimmungen durchgeführt.

3.6.2. Zu allen Röhrchen wurde 100 µl S-cAMP-PME (Jod 125) zugegeben. Anschließend wurde geschüttelt.

3.6.3. Dann wurde zu jedem Röhrchen das Antiserum (Kaninchen) gegeben.

3.6.4. Die Proben wurden anschließend bei 2 - 4° für 18 Stunden inkubiert.

3.6.5. Der Antigen-Antikörper-Komplex, der sich gebildet hatte, wurde mit 2,5 ml einer 60%igen Amonium-Sulfat-Lösung ausgefällt. Anschließend wurde erneut geschüttelt.

3.6.6. Dann wurde für 10 Minuten bei 5000 Umdrehungen pro Minute zentrifugiert (Kühlzentrifuge 4°C).

3.6.7. Der Überstand wurde abgesaugt und der Niederschlag im Szintilationszähler gemessen. Durch das Auswerten der Kurve konnte die Konzentration der einzelnen Proben bestimmt werden. Die aufgeführten Reagenzien wurden von der Firma Becton-Dickinson geliefert.

Die Aufarbeitung des Gehirngewebes wurde, wie im vorhergehenden Kapitel, nach derselben Methode vorgenommen. Erst für die Verarbeitung wurde der trockene Rückstand mit 1,5 ml Natrium-Acetat-Puffer versetzt und davon 300 µl für den Radioimmunoessay verwendet. In den folgenden Kapiteln sind die einzelnen Untersuchungsergebnisse aufgeführt.

3.7. cAMP-BESTIMMUNG VON HIRNGEWEBE

Sechs Tiere wurden getötet und das Frontalhirn entnommen. Die Tabelle 1 zeigt die Werte von cAMP der Tiere, die kein Piracetam erhielten:

Tabelle 1:

Hirn 1	170 pMol
Hirn 2	101 pMol
Hirn 3	114 pMol
Hirn 4	282 pMol
Hirn 5	222 pMol
Hirn 6	197 pMol
Mittelwert:	181 pMol

Acht Tage lang wurden zwei Tiere mit Piracetam gefüttert und weitere acht Tage unter den restlichen Tieren gehalten. Die Tabelle 2 zeigt die Ergebnisse der cAMP-Bestimmung:

Tabelle 2:

Hirn 11	210 pMol
Hirn 21	220 pMol
Mittelwert:	215 pMol

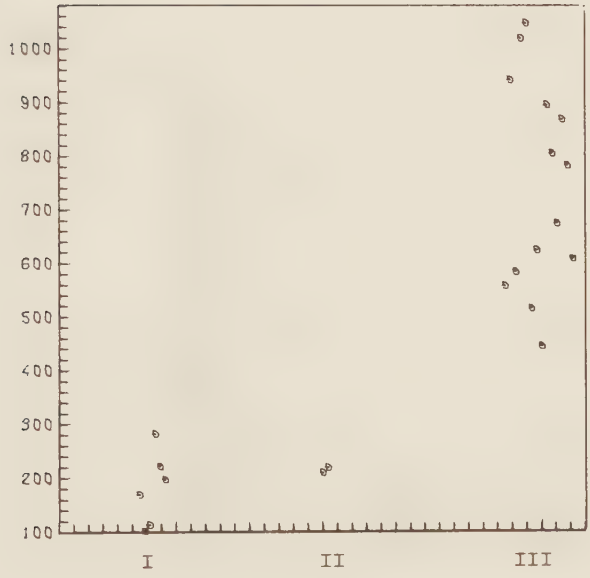
Die restlichen 14 Tiere wurden 16 Tage mit 20 mg Piracetam gefüttert und anschließend getötet. In der Tabelle 3 wurden die Konzentrationen von cAMP im Gehirngewebe aufgeführt.

Tabelle 3:

Hirn 7	585 pMol
Hirn 8	943 pMol
Hirn 9	583 pMol
Hirn 10	1020 pMol
Hirn 12	1049 pMol
Hirn 13	515 pMol
Hirn 14	624 pMol
Hirn 15	444 pMol
Hirn 16	896 pMol
Hirn 17	806 pMol
Hirn 18	674 pMol
Hirn 19	869 pMol
Hirn 20	783 pMol
Hirn 21	609 pMol

Für diese 14 Tiere fand sich ein Mittelwert von 741 pMol.

3.8. GRAPHISCHE DARSTELLUNG DER STREUBREITE DER cAMP-WERTE



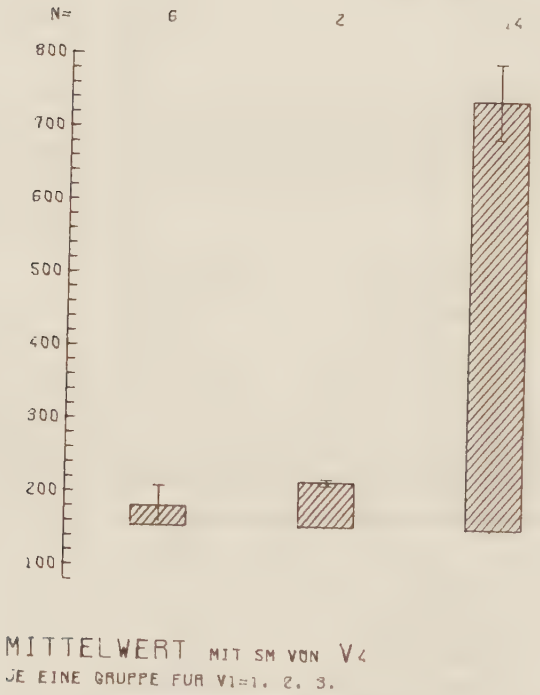
Gruppe I: nicht mit Piracetam behandelt

Gruppe II: 8 Tage mit Piracetam
8 Tage ohne Piracetam behandelt

Gruppe III: 16 Tage mit Piracetam behandelt

Graphik 1 zeigt die Streuung der einzelnen cAMP-Werte der Gruppen I, II und III.

3.9. GRAPHISCHE DARSTELLUNG DER MITTELWERTE DER cAMP-BESTIMMUNG



Graphik 2 zeigt die verschiedenen cAMP-Konzentrationen im Gehirn von der unbehandelten Gruppe I, 8 Tage mit Piracetam gefütterten Gruppe II und 16 Tage mit Piracetam gefütterten Meerschweinchen, Gruppe III.

3.10. STATISTISCHE AUSWERTUNG

Die statistische Auswertung wurde mit Hilfe des verteilungsunabhängigen U-Tests am Rechenzentrum der Universität Würzburg durchgeführt. Als Significanz wurde eine Irrtumswahrscheinlichkeit von $p < 0,05$ angenommen.

Behandlungsgruppen	n	$\bar{x}$	S	FG	U	P
I/II	6 2	181 215	68,04 7,01	6	4,0	$p < 0,65$
I/III	6 14	181 741	68,04 194,79	18	0,0	$p < 0,001$
II/III	2 14	215 741	7,01 194,79	14	0,0	$p < 0,05$

Zusammenfassung der Ergebnisse von Hirngewebe:

Die nicht inkubierten Tiere hatten eine niedrigere cAMP-Konzentration (75).

Der Mittelwert der unbehandelten Tiere betrug 181 pMol.

Die Tiere 11 und 22, die acht Tage gefüttert und weitere acht Tage nicht mehr mit Piracetam gefüttert wurden, zeigten eine mittlere cAMP-Konzentration von 215 pMol. Die Steigerung von cAMP betrug 19 %.

Die restlichen 14 Tiere ergaben einen Mittelwert von 741 pMol. Somit darf durch eine 14tägige Fütterung ein erneuter cAMP-Anstieg festgestellt werden. Die Steigerungsrate betrug 310 %.

4. ZUSAMMENFASSUNG DER ERGEBNISSE

4.1. METHODE

4.1.1. Trichloressigsäuremethode

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, daß durch eine Überarbeitung der Methoden, wie sie von der Firma Becton and Dickinson für cyclische Nukleotide angegeben wurde, eine wesentlich bessere Ausbeute erzielt werden konnte. So wurde bei der Bestimmung mit der "Trichlor-Essigsäure-Methode" gefunden, daß im Überstand ca. 90 % der cyclischen Nukleotide waren.

Dies wurde in der Originalvorschrift übersehen. Dort wurde nämlich mit dem Niederschlag weitergearbeitet.

4.1.2. Perchlorsäure-Methode

Bei der Bestimmung mit der "Perchlorsäure-Methode" konnte durch Neutralisieren der Lösung mit Kalium-Carbonat (5N K_2CO_3) eine Ausfällung der Perchlorsäure erzielt werden. Das anschließende Reinigen mit einer neutralen Lösung über einer Dowex-Säule konnte deshalb zu den angegebenen Werten führen.

4.1.3. Vakuumverdampfungsmethode

Eine entscheidende Bedeutung brachte die neuentwickelte Verdampfungsapparatur. Bisher wurden die Lösungen im Wasserbad bei 60°C eingedampft oder man blies Stickstoff durch die Lösung. Dieser Arbeitsprozeß nahm ca. sechs Stunden in Anspruch. Es versteht sich von selbst, daß Lösungen, die bei 60°C über mehrere Stunden gehalten werden, an Konzentration von cyclischen Nukleotiden verlieren.

Durch die neuentwickelte apparative Änderung, die äußerst billig und aus Abfallprodukten der Klinik konstruiert ist, konnte eine erhebliche Ausbeutesteigerung erzielt werden. Das Eindampfen unter Vacuum ist zwar schnell möglich, aber wie bereits beschrieben, tritt dabei fast immer ein Siedeverzug ein. Dadurch werden falsche Konzentrationsangaben gefunden. Eine technisch elegante Methode ist das Eindampfen mit einem Rotationsverdampfer; dieses Gerät führt jedoch ebenfalls zu einem Siedeverzug, der nur nicht so häufig wie unter Vacuum alleine eintritt (durch die Bewegung des Eindampfkolbens tritt nicht so häufig ein Siedeverzug ein). Der Nachteil bei diesem Verfahren liegt darin, daß die eingedampften Bestandteile aus dem Rotationsverdampferkolben gespült werden, was wieder zu höherem Volumen führt und bei späterer Bestimmung nicht günstig ist.

Die Luftstrom-Vacuum-Methode, wie sie hier in der Arbeit zum ersten Mal beschrieben wurde, verhindert durch geringen Luftstrom einen Siedeverzug. Deshalb konnte das Gewebe, das durch eine Wasserstrahlpumpe erzeugt wird, ohne Verluste eingedampft werden. Dieses Gerät kann man selbst herstellen und kostet nichts. Mehrere Institute (München, Frankfurt) haben diese Methode ebenfalls jetzt übernommen.

4.2. MESSERGEBNISSE VON cAMP

Anhand dieser Methoden wurde Frontalhirn-Gewebe von Meerschweinchen aufgearbeitet. Sechs Meerschweinchen wurden sofort aufgearbeitet und 16 Meerschweinchen wurden täglich mit 20 mg Piracetam (100 µl aus einer Nootrop-Ampulle) gefüttert, was einer täglichen Gabe von 2000 - 2500 mg Piracetam entspräche, und anschließend nach derselben Methode aufgearbeitet. Zwei Meerschweinchen wurden acht Tage mit Piracetam gefüttert, die restlichen 14 Tiere wurden insgesamt 16 Tage mit Piracetam gefüttert. Diese 14

Tiere wurden zur gleichen Zeit getötet. Es zeigte sich, daß diese "neurotrope" Substanz einen signifikanten Einfluß auf das cyclische AMP hat, was in einer Arbeit zum ersten Mal beschrieben wurde. Die cyclischen Nukleotide, die gleich einer hormonellen Wirkung zu einer Aktivierung der Stoffwechsel der Zelle beitragen (siehe allgemeiner Teil), werden hier ebenfalls gesteigert. Da es heute schwierig ist, bei einer neurotropen Substanz, die mit unterschiedlichen Indikationen (Apoplex, Lernstörungen, Alkoholabusus) eingesetzt wird, eine Wirkungsspezifität nachzuweisen, kann die Arbeit über cyclische Nukleotiden bei Piracetam zur Wirkungsaufklärung von neurotropen Substanzen beitragen.

5. DISKUSSION

5.1. METHODEN

5.1.1. Trichloressigsäure-Methode

In der Arbeit konnte auf die von der Firma Becton und Deckinson vorgelegten Arbeitsvorschriften, die nach STEINER et al. (1974) modifiziert sind, hingewiesen werden. So wurde nach dem Zentrifugieren der homogenisierten Gewebeteilchen mit dem Niederschlag weitergearbeitet, obwohl sich 90 % der cyclischen Nukleotide im Überstand befanden. (Bisher ist nach Angabe der Firma noch keiner Arbeitsgruppe an anderen Universitäten der Fehler aufgefallen.)

Die Trichloressigsäure enthaltenden Lösungen wurden mit Äther extrahiert. Dabei zeigte sich, daß die Trichloressigsäure durch zweimalige Ätherextraktion nicht vollständig war. Es muß unbedingt mindestens viermal mit Äther extrahiert werden, daß das cAMP-Antiserum zerstört wird. Die Ausbeute ist nicht nur niedriger, sondern es treten starke Schwankungen unter den einzelnen Bestimmungen auf.

5.1.2. Perchlorsäure-Methode

Die Vorschrift für die Perchlorsäure-Methode wurde um eine Variante bereichert. Im Gegensatz zur Originalvorschrift wurde nicht die saure Lösung über die Chromatographie-Säule gegeben, sondern die Lösung wurde mit fünf normaler Kalium-Carbonat-Lösung neutralisiert.

Somit bildete sich ein Kaliumperchlorat-Niederschlag, der abzentrifugiert wurde. Die Lösung wurde dadurch erheblich salzfreier. Obwohl Störungen durch Chlorat-Lösungen auf den cAMP-Antikörper nicht untersucht wurden, darf man bei einer ionenärmeren Lösung doch von einem Vorteil sprechen.

5.1.3. Vakuum-Verdampfungs-Methode

Sämtliche Lösungen mußten bis zur Trocknung eingedämpft werden. In dieser Arbeit wurde zum ersten Mal dieses Prinzip beschrieben. Durch dieses Verfahren konnte der Zeitaufwand für das Verdampfen erheblich reduziert werden. Außerdem ist es leicht verständlich, daß das Eindampfen von Lösungen erheblich schonender ist, wenn nur 1/5 der Zeit aufgewendet werden muß. Durch diese methodische Erneuerung wurde die Ausbeute erheblich gesteigert (30 - 40 %). Dieses neue Verfahren ist durch die Konstruktion aus einfachem Material möglich (siehe Methoden). Das Eindampfen durch einen Rotationsverdampfer bzw. Lyophysilator war an unserer Klinik nicht möglich. Diese Verfahren sind dazu noch erheblich aufwendiger. Nicht nur der Zeitaufwand spielt eine Rolle (statt 45 Minuten nur 5 - 8 Minuten), sondern auch der Preis für die oben genannten Geräte (7000 DM).

Es ist trotzdem nicht zu verkennen, daß der Aufwand für die Untersuchungen noch hoch ist. Um Schwankungen auszuschließen, mußten stets mehrfache Bestimmungen durchgeführt werden. So waren 9000 - 9500 Pipetierungen notwendig, um dieses Ergebnis zu sichern. Durch die Bestimmung der cyclischen Nukleotide mit Hilfe eines Radioimmunoessay (RIA) sehen wir einen erheblichen Vorteil; nicht nur, weil die Bestimmung in geringer Konzentration (pMol) möglich ist, sondern weil bei diesem Verfahren äußerst selten Schwankungen über 10 % auftraten.

5.2. MESSERGEBNISSE VON cAMP

5.2.1. Die Bestimmung von cAMP im Gehirn (Frontalhirn)

Die sechs unbehandelten Tiere hatten eine cAMP-Konzentration von 181 pMol. Die zwei Meerschweinchen, die acht Tage gefüttert wurden mit Piracetam und weitere acht Tage ohne Piracetam gehalten wurden, zeigten eine cAMP-Konzentration von 215 pMol.

Die restlichen 14 Tiere, die 16 Tage mit Piracetam gefüttert wurden, zeigten einen Mittelwert von 741 pMol.

Die Steigerungsrate lag mit 310 % gegenüber den unbehandelten Tieren erheblich höher.

5.2.2. Wertung der Ergebnisse

Die Ergebnisse der cAMP-Bestimmung dürfen deshalb in folgenden Punkten diskutiert werden:

a) Piracetam steigert die cAMP-Konzentration in den Zellen von Gehirngewebe.

b) Somit hat Piracetam einen positiven Einfluß auf die Reaktionskaskade, die durch cAMP ausgelöst wird.

c) Der cAMP-Anstieg führt zur Aktivierung der Proteinkinase und Phosphorylase.

d) Die Kinasen ändern die Aktivität verschiedener Proteine in verschiedenen Zellen, indem sie sie phosphorylieren.

Somit wird verständlich, was mehrere Autoren (GOBERT, PLATT, PLATT et al., BURNOTTE) zeigten, daß durch Gabe von Piracetam Aminosäuren eingebaut werden, Proteine aufgebaut werden und eine Zunahme von Ribosomen stattfindet.

Um die Untersuchungsergebnisse zu kontrollieren, haben wir

Gehirngewebe in einer glukosenreichen Lösung (Sterofundin L5, Braun, Melsungen) inkubiert. Da cAMP die Glykogensynthetase inaktiviert, konnte hier gezeigt werden, daß bei einem hohen Glukosespiegel (50 g/l) ein Anstieg der cAMP-Konzentration verzögert wird (75).

Für Kleinhirn wurden Konzentrationen zwischen 620 und 1400 pMol/g Naßgewicht angegeben.

Darüber hinaus muß die Frage diskutiert werden, ob Piracetam einen Einfluß auf das Altern der Zellen hat.

Bereits mehrere Autoren (Zusammenfassung, LENINGER 1979) fanden an Tumorzellen einen erniedrigten cAMP-Spiegel. Deshalb sollte doch hier die Frage gestellt werden, ob ein cAMP-Anstieg nicht nur das Tumorwachstum beeinflußt, sondern auch auf das Altern der Zellen einwirkt. Durch den Anstieg von cAMP wird eine Zellteilung auf eine spätere Zeit hinausgeschoben, aber eine höhere Differenzierung der Zelle erreicht. Man spricht davon, daß Zellen durch einen höheren cAMP-Spiegel sich länger in der S_1-Phase befinden. Menschliche Zellen teilen sich ungefähr 60 mal. Da die Zellteilung auf einen späteren Zeitpunkt verlegt wird, muß von der Substanz Piracetam ein Einfluß auf das Altern diskutiert werden.

6. ALLGEMEINE ZUSAMMENFASSUNG

In der vorliegenden Arbeit wurden 22 erwachsene weiße Meerschweinchen aus einem Inzuchtstamm auf den cAMP-Spiegel untersucht. Sechs Tiere, ohne Piracetam gefüttert, hatten einen cAMP-Spiegel im Gehirn von 181 pMol/g. Acht Tage wurden zwei Tiere mit Piracetam gefüttert und weitere acht Tage mit den restlichen Tieren gehalten. Der Mittelwert betrug 215 pMol/g. Dies bedeutet einen Anstieg von 19 %. Die restlichen 14 Tiere wurden 16 Tage lang mit 20 mg Piracetam gefüttert und anschließend getötet. Diese 14 Tiere hatten einen Mittelwert von 741 pMol/g. Somit errechnet sich ein Anstieg der cAMP-Konzentration im Gehirn auf 310 %. Da das cAMP einen Einfluß auf die Proteinkinase und Phosphorylase hat und diese aktiviert und gleichzeitig die Glykogensynthetase hemmt, reihen sich diese Ergebnisse in die bereits festgestellten anabolen Stoffwechselvorgänge ein. Ein hoher cAMP-Spiegel führt zu Zelldifferenzierung und verhindert eine Zellenreplikation. Da sich menschliche Zellen ungefähr 60 mal teilen, muß durch den hohen cAMP-Spiegel, der eine Zellteilung hinauszögert, von einem Altersparameter gesprochen werden. Die Befunde werden denen der Literatur gegenübergestellt und diskutiert.

Durch die Einführung der Vakuum-Verdampfungsmethode, die hier ebenfalls zum ersten Mal beschrieben wird, kann die Ausbeute erheblich gesteigert werden.

Bei Herrn Professor Dr. Franke, Direktor der Medizinischen Universitäts-Poliklinik bedanke ich mich, daß ich bei ihm am Institut die Arbeit ausführen konnte.

Herrn Prof. Dr. Gross, Oberarzt der Medizinischen Poliklinik, danke ich für die Übernahme des Referates. Seine Hilfe hat zum Gelingen der Arbeit beigetragen. Außerdem möchte ich mich noch recht herzlich für sein freundliches Verhalten bedanken.

Meinem Freund, Herrn Dr. Werner Bremer, Arzt für HNO, in der hiesigen Universitätsklinik, danke ich vielmals für die Narkotisierung und Präparation der Versuc-hstiere.

Frau Dr. Haubitz gilt mein besonderer Dank für die mathematische Auswertung der Ergebnisse.

7. LITERATUR

1. AANTAA, E., O. H. MEURMANN:
The effect of Piracetam (UCB 6215) upon the late symptoms of patients with skull injuries.
J. int. med. Res. 3 (1975) 352

2. ARON, E., E. NEROT:
Le piracetam dans le traitement de l'alcoholisme aigu et chronique.
Rev. méd. Tours 9 (1975) 1227

3. BAUER:
UCB-Chemie.
Persönliche Mitteilung (1980, 1981), Würzburg

4. BAVING, G.:
Untersuchungen über Piracetam (2-Oxopyrrolidin-1-acetamid) bei stationären Patienten mit cerebrovaskulär bedingter geistiger Leistungsminderung, schwerer obstruktiver Emphysembronchitis und arterieller Hypoxie.
Therapiewoche 25 (1975) 2421

5. BERTRAND, U.:
Intérêt du Piracetam comme correctur de dysmnesie consecutive a la sismotherapie.
Kongreß für Psychiatrie u. Neurologie, 69. Sitzung, Caen 1971

6. BINDER, S., P. DODDABELA:
Die Wirkung von Piracetam auf das geistige Leistungsverhalten chronischer Alkoholiker.
Med. Klin. 71 (1976) 711

7. BITENSKY, M. W., R. E. GORMAN:
Cellular responses to cyclic AMP.
Progr. Biophys. Mol. Biol. 26 (1973) 409 - 461

8. BORK, D., K. KÖHL, A. SELUGGA, G. SELUGGA-REINSCHENK, S. TRAXTER:
Die Wirkung von Piracetam auf die cerebrale Leistungsfähigkeit bei chronischen Alkoholikern.
Therapiewoche 26 (1976) 6971

9. DE BUCK, R., H. BOON, I. PELC, R. TITECA:
Orientierende Untersuchung mit Piracetam (UCB 6215) bei akutem und chronischem Alkoholismus und einigen anderen Drogenabhängigkeiten.
Vortrag, VII. Internationaler Kongreß der C.I.N.P., Prag 1970

10. BURNOTTE, R. W., J. G. GOBERT, J. J. TEMMERMANN:
Piracetam (2-pyrrolidone-acetamine) induced modifications of the brain polyribisome pattern in aging rats.
Biochem. Pharmacol. 22 (1973) 811

11. CALLIAUW, L., M. MARCHAU:
Etude clinique controlée de l'UCB 6215 sur les troubles de la conscience consécutifs à un traumatsme crânien.
V. Internationaler Kongreß für Neurochirurgie, Tokio 1973

12. CIOCATTO, E.:
Rapport sur l'utilisation clinique du Piracetam dans les troubles de la conscience induits par les psychotropes.
(Pers. Mitt., Università di Torino, Istituto dell' Anestesiologia e di Reanimazione, Italien)

13. DELWAIDE, P. J., M. YLIEFF, A. M. GYSELNYCK-MAMBOURG, L. DIJEUX, A. HURLET:
Wirkungen von Piracetam bei seniler Demenz.
Méd. et Hyg. (Genève) 33 (1975) 1158

14. DICKENS, F., RANDLE, P. J., W. J. WHELAN (eds.):
Carbohydrate metabolism and its disorders.
Vols. 1 and 2, Academic Press 1968

15. DIMOND, J. St., E. Y. M. BROUVERS:
Increase in the power of human memory in normal man through the use of drugs.
Psychopharmacoligie 49 (1976) 307

16. FERREY, G., D. BOUTTIER:
Utilisation du Piracetam dans les syndromes subjectifs des traumatisés du crâne observés dans un service de psychiatrie d'hôpital général thérapeutique.
Sem. Hôp. Paris 48 (1972) 143

17. FERUGLIO, F. S., C. MACCHIONE, M. MOLASCHI:
La 2-pyrrolidoneacetamid (Piracetam) dans le syndrome psychoorganique sénile.
Sa, Sett. Ital. di Tarapia, Montecatini Terme 1974

18. FRANKE, M.:
Polypathie und Multimorbilität im Alter

19. GILL, G. N., L. D. GARREN:
Role of the receptor in the mechanism of action of adenosine 3':5'-cyclic monophosphate.
Proc. Nat. Acad. Sci. 68 (1971) 786 - 790

20. GIURGEA, C. E., D. LEFÈVRE, C. LESCRENIER, M. DAVID-REMACLE:
Pharmacological protection against hypoxia-induced amnesia in rats.
Psychopharmacologia (Berl.) 10 (1971) 160

21. GIURGEA, E. E., F. MOURAVIEFF-LESUISSE, R. LEEMANS:
Corrélations électro-pharmacologiques au cours de l'anoxie oxyprive chez le lapin en respiration libre ou artificielle.
Rev. neurol. 122 (1970) 484

22. GIURGEA, C. E., F. MOURAVIEFF-LESUISSE:
Effet facilitateur du Piracetam sur un apprentissage répetitif chez le rat.
J. Pharmacol. (Paris) 3 (1972) 17

23. GIURGEA, C. E., F. E. MOYERSOONS:
On the pharmacology of cortical evoked potentials.
Arch. int. Pharmacodyn. 199 (1972) 67

24. GOBERT, J.:
Génèse d'un médicament, le Piracetam. Métabolisation et recherche biochimique.
J. Pharm. Belg. 27 (1972) 281

25. HAGEN, K.:
Vorläufige Erfahrungen mit Piracetam in der kinder- und jugendpsychiatrischen Praxis.
Therapiewoche 27 (1977) 6129

26. HEINITZ, M.:
Neue Aspekte zur Therapie der cerebralen Insuffizienz durch Piracetam.
Fortschr. Med. 93 (1975) 293

27. HELMRICH, E., ZENNER, H., PFEUFFER, TH.:
Signal Transfer from Hormone Receptor to Adenylatelyclose
Academica Press, JNC.
New York, San Francisco, London S 42-86, 1976

28. HERRSCHAFT, H.:
Die regionale Gehirndurchblutung (Meßmethoden, Regulation, Veränderungen bei den cerebralen Durchblutungsstörungen und pharmakolgische Beeinflußbarkeit).
Neurologische Serien/Neurology series.
Springer, Berlin-Heidelberg-New York 1975

29. HERRSCHAFT, H.:
Gehirndurchblutung und Gehirnstoffwechsel (Meßverfahren, Physiologie, Pathophysiologie, Veränderungen bei den hirnorganischen Erkrankungen, Pharmakologie).
Thieme, Stuttgart 1976

30. HERRSCHAFT, H.:
Die Wirkung von Piracetam auf die Hirndurchblutung des Menschen.
Med. Klinik (1978) 195 - 202 (Nr. 6)

31. HERRSCHAFT, H., F. GLEIM, H. SCHMIDT, U. KUNZE:
Die Wirkung von Actovegin^{R} auf die Gehirndurchblutung und den Gehirnstoffwechsel des Menschen.
Med. Welt (Stuttgart) 28 (N.F.) (1977) 339

32. HERRSCHAFT, H., U. KUNZE:
Correlation between clinical picture, EEG and change of cerebral flow after occlusion of the middle cerebral artery in man.
J. Neurol. 216 (1977) 191

33. HOYER, S., G. KRÜGER, K. OESTERREICH, F. WEINHARDT:
Drug effect on oxidatve brain metabolism in demented patients. Proc. of the 8th Salzburg Conf., Thieme, Stuttgart (in Vorbereitung)

34. JACOB, WYATT, ZENSER, zitiert nach REILLY:
Wissenschaftl. Reihe, Becten Dickinson.

35. KREBS, E. G., E. H. FISCHER:
Biochim. Biophys. Acta 20 (1956) 150

36. LAGERGREN, K., S. LEVANDER:
A double blind study on the effects of Piracetam upon perceptual and psychomotor performance at varried heart rates in patients treated with artificial pacemakers.
Psychopharmacologia (Berl.) 39 (1979) 97

37. LENINGER, A.:
Biochemie 2, neubearbeitete und erweiterte Auflage.
Verlag Chemie 1979

38. MINDUS, P., P. CRONHOLM, S. LEVANDER, D. SCHALLING:
Effects of piracetam an anxiety and mental performance in middle-aged healthy volunteers.
VII. Europ. Congr. of Clin. Geront., Manchester 1974

39. MINDUS, P., B. CRONHOLM, S. Levander, D. SCHALLING:
Piracetam induced improvement of mental performance.
Acta psychiat. scand. 54 (1976) 150

40. MOYERSOONS, F., C. E. GIURGEA:
Protective effect of Piracetam in experimental barbiturate intoxication: EEG and behavioural studies.
Arch. int. Pharmacodyn. 210 (1974) 38

41. NAESSENS, P. J., L. DE WAELE:
Orientierende Untersuchung von Piracetam bei 50 Fällen von posttraumatischem und postoperativem Coma in der Neurochirurgie.
Ars. Med. 2 (1973) 1205

42. NEWSHOLME, E. A., C. START:
Regulation in metabolism.
Academic Press (1973), Kapitel 4 (Regulation des Glykogen-Stoffwechsels)

43. OSTROWSKI, J., M. KEIL, E. SCHRAVEN:
Autoradiographische Untersuchungen zur Verteilung von Piracetam C bei Ratte und Hund.
Arzneimittelforschung 25 (1875) 589

44. PASTAN, I.:
Cyclic AMP.
Sci. Amer. 227 (2) 1972, Seite: 97 - 105
(erhältlich als Sci. Amer. Sonderdruck 1256)

45. PEARSE, A. G. E.:
Common cytochemical and ultrastructural characteristics of cells producing hormones (the APUD series) and their relevance to thyroid and ultimobranchial C cells and calcitonin.
Proc. Roy. Soc. B 170 (1968) 71

46. PEARSE, A. G. E.:
The cytochemistry and ultrastructure of polpeptide hormone-producing cells of the APUD series and the embryologic, physiologic and pathologic implications of the concept.
J. Histochem. Cytochem. 17 (1969) 303

47. PEDE, J. P., L. SCHIMPFESSEL, R. CROKAERT:
The action of piracetam on oxydative phosphorylation.
Arch. int. Physiol. Biochem. 79 (1971) 1036

48. PLATT, D.:
Age dependent determinations of lysosomal enzyme activities in the liver and brain as well as the measurement of cytoplasmic enzyme activities in the blood of Piracetam pretreated rats.
Exp. Geront. 8 (1973) 315

49. PLATT, D., H. HERING, F. J. HERING:
Messungen lysosomaler Enzym-Aktivitäten sowie von Leuzin-Inkorporationsraten im Gehirn junger und alter Ratten nach Gabe von Piracetam.
ArzneimittelForschung 24 (1974) 1588

50. PFEUFFER:
Persönliche Mitteilung, Institut für Physiologische Chemie Universität Würzburg

51. REILLY:
Wissenschaftliche Reihe, Becton Deckinson

52. ROBINSON, G. A., BUTCHER, R. W., E. W. SUTHERLAND:
Cyclic AMP.
Academic Press (1971)

53. ROQUEFEUIL, B., E. ESCURET, E. VIGUIÉ:
Wirkung von Piracetam auf den Hirnstoffwechsel auf den Patienten einer neurochirurgischen Intensivstation.
Agressologie 16 (1975) 43

54. SCHAUER, R.:
The mode of action of hormones.
Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 11 (1972) 7 - 16

55. SCHILLER, E.:
Elektronenmikroskopische und mikrointerferometrische Beiträge zum Wirkungsmechanismus von Piracetam.
V. Herbsttagung der dtsch. Ges. Path., Mainz 1974

56. SCHUCHARDT, G.:
Erfahrungsbericht aus einer Nachsorgeklinik für Hirnbeschädigte unter Berücksichtigung der neuartigen Substanz Piracetam.
Therapiewoche 25 (1975) 6430

57. SCHULTE AM ESCH, J., G. PFEIFER:
Vorläufige Erfahrungen mit Piracetam in der Intensivtherapie schwerer Schädel-Hirn-Verletzungen.
Med. Klin. 69 (1974) 1235

58. Segink, A. J.:
The clinical use of Piracetam, a new nootropic drug.
Arzneimittel-Forschung 22 (1974) 975

59. STEINER, A. L., CH. W. PARKER, D. M. KIPNIS:
Radioimmunoassay for cyclic nucleotides.
J. Biol. Chem. 247 (1972) 1106

60. STREHL, W., A. BROSSWITZ:
Klinische Beobachtungen über die Wirkung von Piracetam auf einige Hirnfunktionen bei Schulkindern im doppelten Blindversuch.
Therapiewoche 22 (1972) 2975

61. STRYER, L.:
Biochemie.
Friedrich-Vieweg & Sohn-Verlagsgesellschaft, Braunschweig 1979

62. SUCHENWIRTH, R.:
Erste Erfahrungen mit Piracetam als nootroper Substanz bei hirnorganisch bedingten psychischen Störungen.
Med. Wschr. 27 (1973) 467

63. SUTHERLAND, E. W.:
Studies on the mechanism of hormone action.
Science 177 (1972) 401 - 408

64. SUTHERLAND, E. W., T. W. RALL:
The properties of an adenine ribonucleotide produced with cellular particles, ATP Mg^{++} and epinephrine or glucagon.
J. Amer. Chem. Soc. 79 (1957) 3608

65. SUTHERLAND, E. W., G. A. ROBINSON, R. W. BUTCHER:
Some aspects of the biological role of adenosine 3', 5'-monophosphate (cyclic AMP).
Circulation 37 (1968) 269

66. THIEBAULD, CH.:
Verbesserung geistiger Leistungen durch eine Substanz mit spezifisch corticaler Wirkung.
30éme Congrès Franc. Méd., Beirut 1971

67. TOSCANO, M., K. G. VAN DEN ABBEELE, J. MENDLEWICZ:
Pilot study of UCB 6215 in the psychiatric clinic.
Vortrag, VII. Int. Kongr. der C.I.N.P., Prag 1970

68. TRABER, J.:
Doktorarbeit, Universität München, 1976

69. ULBRICHT, B.:
Über die klinische Anwendung von Piracetam bei chronischem Alkoholismus und dessen Komplikationen, Prädelir und Delir.
Med. Welt (Stuttgart) 27 (N.F.) (1976) 1912

70. VIALATTE, J.:
Klinische Prüfung von Piracetam bei Kindern.
Vie méd. 18 (1973) 2327

71. VOELKEL, A.:
Über das Wirkungsprofil von Piracetam bei Psychosyndromen und symptomatischen Psychosen.
Arzneimittel-Forschung 24 (1974) 1127

72. WEDL, W., R. SUCHENWIRTH:
Eigenwirkungen des GABA-Abkömmlings Piracetam im doppelten Blindversuch bei gesunden Probanden.
Nervenarzt 48 (1977) 58

73. WECKROTH, J.:
On the effect of Piracetam on certain intellectual, perceptual and psychomotor performance traits and traits of subjectively rated mental state.
Amsterdam (1972)

74. WETH, G.:
Unveröffentlichte Ergebnisse.
In Vorbereitung

75. WETH, G.:
2. Internationaler Kongreß neurotroper Substanzen.
Mexico-City, Mai 1980

76. WOLTHIUS, O. L.:
Pharmacological influencing of learning and memory processes.
Natuur en techniek 41 (1973) 547

LEBENSLAUF

Als erstes Kind der Eheleute Ludwig und Irmgard Weth, geb. Storg, wurde ich am 20.10.1946 in Schweinfurt geboren. Nach dem Besuch der 8. Volksschulklasse wechselte ich 1961 in das humanistische Gymnasium Theresianum in Bamberg über. Dort legte ich 1968 die Reifeprüfung ab. Im Oktober 1968 immatrikulierte ich mich für Chemie und unterzog mich Oktober 1971 der Diplomprüfung sowie Oktober 1973 der mündlichen Diplomhauptprüfung. Meine Diplomarbeit reichte ich am 2. September 1974 ein.

Im Mai 1972 bewarb ich mich für das Studium der Medizin. Im Oktober des gleichen Jahres legte ich das Vorphysikum, im Oktober 1976 das Physikum ab. Am 23. April 1980 erhielt ich die Approbation als Arzt.

Bei den Studentenparlamentswahlen wurde ich zweimal als Vertreter der Naturwissenschaftlichen Fakultät ins Studentenparlament gewählt. Zusätzlich war ich Mitglied des Übergangssprecherrates und verschiedener anderer Universitätsausschüsse, so des Senats der Universität. Als Mitglied der Studienreformkommission für Chemie wurde ich vom Bayerischen Kultusminister nach München eingeladen.

Seit Februar 1980 arbeite ich als Arzt an der Med. Poliklinik der Universität Würzburg.

An meiner Promotion arbeite ich seit Juli 1980.

Gosbert Weth

Dissertationsdruck
Schmitt & Meyer

Würzburg Ludwigkai 28a Tel. 7 23 80

Dissertationsdruck
Schmitt & Meyer

Würzburg Ludwigkai 28a Tel. 7 23 80